



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

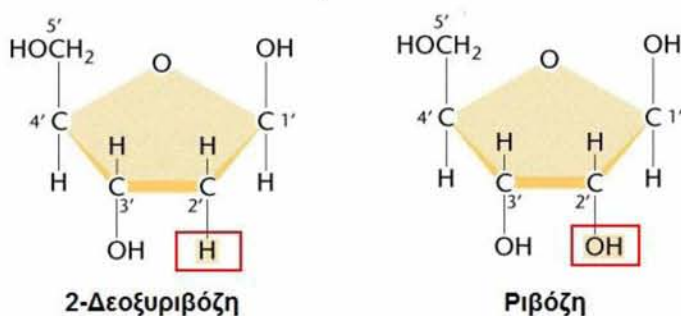
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΤΣΕΛΑΝΗ ΝΤΑΪΕΝΑ

Διπλωματική Εργασία

**2'-δεοξυ-φουρανονουκλεοζίτες ως νέοι κυτταροτοξικοί παράγοντες:
Σχεδιασμός, σύνθεση και προσδιορισμός δομής μέσω φασματοσκοπικής
ανάλυσης.**



ΛΑΡΙΣΑ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κοιμώτης Δημήτριος: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων

Αμούτζιας Γρηγόριος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική

Μόσιαλος Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του προγράμματος Π.Μ.Σ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ως προς την διεκπεραίωση του πειράματός μου στο εργαστήριο καθώς και για τις εποικοδομητικές υποδείξεις του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Νικόλαο Κολλάτο για την υποστήριξη και τη βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς η εμπειρία του και οι συμβουλές του αποτέλεσαν σημαντικά εφόδια για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1.1. Υδατάνθρακες	6
1.2. Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης	8
1.3. Νουκλεοζίτες	9
1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	11
1.5. Νουκλεοζίτες ως αντιϊκοί παράγοντες	15
1.6. Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες	17
1.7. Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση	19
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	24
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	25
3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography).....	25
3.2. Χρωματογραφία στήλης.....	27
3.3. Ξήρανση διαλυτών	28
3.4. Ταυτοποίηση ενώσεων	28
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	29
4.1. Επισκόπηση της συνθετικής οδού	29
4.2. Μεθοδολογία της σύνθεσης	30
4.2.1. Σύνθεση της 1-(3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη) -5-ιωδοουρακίλης (2) 31	
4.2.2. Σύνθεση των (3).....	32
4.2.3. Σύνθεση των (4).....	33
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR - Φάσμα ^1H NMR του προϊόντος 3α	34
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	35
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι χημικές ενώσεις της κατηγορίας των υδατανθράκων συναντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία πολύ- υδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών, που στην κοινή ορολογία αναφέρονται ως σάκχαρα. Πολλοί υδατάνθρακες μετά από τροποποιήσεις βρίσκονται στο περίβλημα των κυττάρων, αποτελώντας μέρος αυτού, άλλοι απαντώνται στο DNA, ενώ πολλοί χαρακτηρίζονται ως φάρμακα.

Μεγάλος αριθμός νουκλεοζιτικών αναλόγων δρουν ως αντιμεταβολίτες, ανταγωνίζονται τους φυσικούς νουκλεοζίτες και αλληλεπιδρούν με ενδοκυττάριους στόχους. Άλλοι πάλι ενσωματώνονται κατά την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση του DNA, οδηγώντας έτσι στον τερματισμό της διαδικασίας αντιγραφής του ενώ άλλοι λειτουργούν ως αναστολείς της DNA πολυμεράσης.

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να περιγραφεί η πορεία σύνθεσης καινούριων φουρανονουκλεοζιτών, τροποποιώντας μία βάση, με σκοπό τη διερεύνηση και το χαρακτηρισμό τους ως αντικαρκινικοί και αντιϊκοί παράγοντες. Στη συνέχεια, γίνεται πλήρης ανάλυση όλων των συνθετικών οδών, καθώς και των μεθόδων που ακολουθήθηκαν, ενώ παρουσιάζονται αναλυτικά ο τρόπος και τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης τους καθώς και της βιολογικής τους δράσης.

ABSTRACT

Carbohydrates found in every living organism and refer to a broad category of poly-hydroxylated aldehydes and ketones, which are commonly known as sugars. Modified carbohydrates are part of the cells' outer layer, others are found in DNA molecules carrying genetic information, while others are used as medicines.

A large number of nucleoside analogs act as antimetabolites, natural nucleosides compete and interact with intracellular targets. Others incorporated during replication or repair of DNA, leading to the termination of the composition process while others function as polymerase inhibitors.

In this diploma thesis, is described the synthesis of new, base modified furanonucleosides, as potential anti-cancer and antiviral agents. The synthetic pathways that followed, the methods that performed and the results of their identification, as well as their biological evaluation, are analyzed in that work.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Υδατάνθρακες

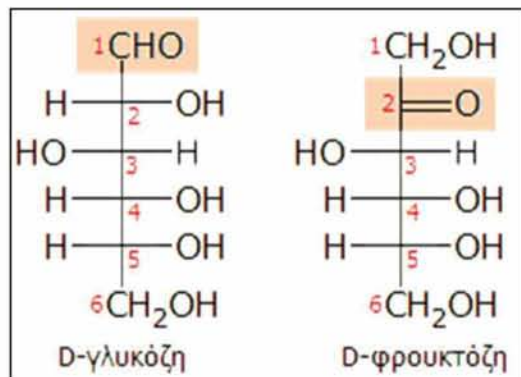
Οι υδατάνθρακες ή αλλιώς όπως αναφέρονται σάκχαρα, έχουν εξαιρετικά σημαντική βιολογική σημασία και μαζί με τις πρωτεΐνες και τα λίπη, αποτελούν τα βασικά συστατικά σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Επιπλέον είναι δομικά συστατικά όχι μόνο των κυττάρων αλλά και μιας ποικιλίας μακρομορίων όπως είναι οι λιπο-πολυσακχαρίτες, οι γλυκο-πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα.

Στην κατηγορία των υδατανθράκων ανήκουν όλες εκείνες οι οργανικές ενώσεις που έχουν γενικό τύπο $(CH_2O)_n$, δηλαδή η αναλογία του υδρογόνου (H) προς το οξυγόνο (O) είναι 2:1. Μία πρώτη κατηγοριοποίηση τους γίνεται λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των σακχάρων που διαθέτουν, με τους μονο- και δισακχαρίτες να χαρακτηρίζονται ως απλοί υδατάνθρακες ενώ τους όλιγο- και πολυσακχαρίτες ως σύνθετοι υδατάνθρακες.

Ένας υδατάνθρακας ο οποίος δεν μπορεί να υδρολυθεί προς απλούστερες ενώσεις καλείται μονοσακχαρίτης, όπως είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη (**Εικόνα 1**). Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να ταξινομηθούν επιπλέον σε άλλες δύο κατηγορίες τις αλδόζες και τις κετόζες. Η κατάληξη -οζη, τόσο στις αλδόζες όσο και στις κετόζες, υπάρχει και υποδηλώνει ότι πρόκειται για υδατάνθρακα, ενώ τα προθέματα αλδο- και κετο-, αποτελούν προσδιορισμό της φύσης της καρβονυλικής ομάδας στην άκυκλη μορφή τους, αν δηλαδή πρόκειται για αλδεΐδη ή κετόνη.

Αναλυτικότερα, οι μονοσακχαρίτες, όπως αναφέρθηκε είναι οι πιο απλοί

υδατάνθρακες και μπορεί να ανήκουν στην κατηγορία των αλδεϋδων ή των κετόνων έχοντα δύο ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Η διυδροξυακετονή και τα δύο ισομερή D- και L- γλυκεραλδεϋδη αποτελούν τους πιο μικρούς μονοσακχαρίτες και ονομάζονται τριόζες καθώς $n=3$. Κατ' αντιστοιχία, απλοί μονοσακχαρίτες που διαθέτουν από τέσσερα έως επτά



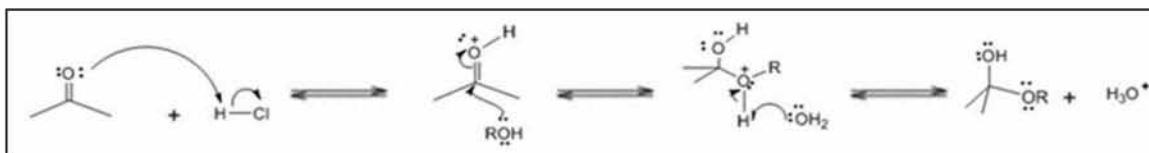
Εικόνα 1: D-γλυκόζη και D-φρουκτόζη

άτομα άνθρακα χαρακτηρίζονται ως τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες. (McMurry, John 2000).

Οι δισακχαρίτες, με χαρακτηριστικά μέλη αυτής της κατηγορίας της σακχαρόζη και τη λακτόζη, είναι υδατάνθρακες ο οποίος όταν υδρολυθούν προκύπτουν δύο μόρια μονοσακχαρίτη. Επιπρόσθετα, υπάρχουν υδατάνθρακες οι οποίοι υδρολύονται και προκύπτουν πολλά μόρια μονοσακχαριτών. Στους πολυσακχαρίτες ανήκει η κυτταρίνη, που αποτελεί το κυριότερο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, το άμυλο και το γλυκογόνο, που αποτελούνται από πολλά μόρια γλυκόζης. Θα πρέπει να σημειωθεί πως οι αναλογία υδρογόνων (H): οξυγόνου (O) ισχύει μόνο τους μονοσακχαρίτες ενώ στα υπόλοιπα είδη σακχάρων διαφέρει (Morison and Boyd, 2001).

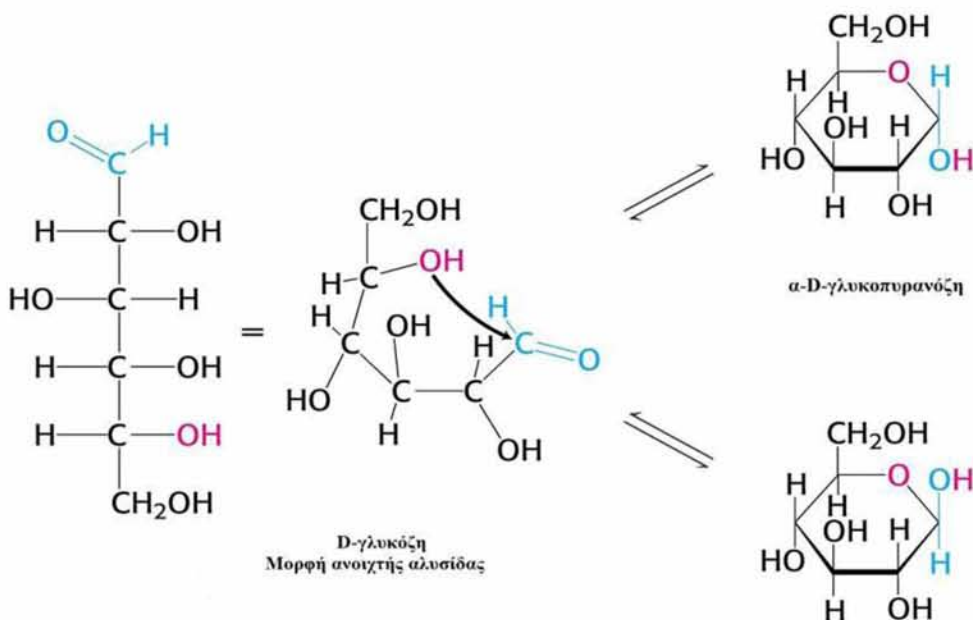
1.2. Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης

Οι δύο μορφές στις οποίες μπορούμε να ανιχνεύσουμε τους μονοσακχαρίτες είναι οι μονοσακχαρίτες ανοικτής και οι μονοσακχαρίτες κυκλοποιημένης μορφής. Η ανοικτή μορφή μπορεί να κυκλοποιηθεί μετά από αντίδραση μιας καρβονυλικής ομάδας με μία υδροξυλομάδα με αποτέλεσμα τη δημιουργίας ημιακετάλης (**Σχήμα 1**).



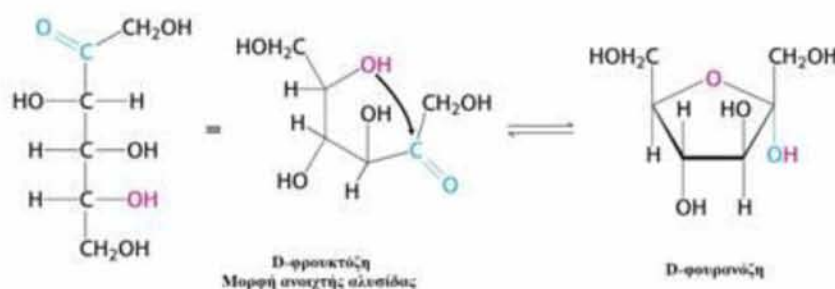
Σχήμα 1: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού ημιακετάλης (Πηγή: McMurry, 2000, p. 905)

Η σταθερότητα των πενταμελών και των εξαμελών εξηγεί το γεγονός ότι πολλοί υδατάνθρακες βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας μεταξύ δομών ανοικτής και κλειστής αλυσίδας. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η γλυκόζη η οποία σε υδατικό διάλυμα βρίσκεται στη μορφή εξαμελούς



Εικόνα 2: Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης

δακτυλίου της πυρανόζης, δομή που οφείλεται στην πυρηνόφιλη προσθήκη του -OH που υπάρχει στο 5° άνθρακα στον 1° καρβονυλικό άνθρακα (**Εικόνα 2**). Εκτός της γλυκόζης, η φρουκτόζη, βρίσκεται ως πεταμελής δακτύλιος φουρανόζης, δακτύλιος που προκύπτει μετά από προσθήκη στον 2° καρβονυλικό άνθρακα του -OH του $5^{\text{ου}}$ άνθρακα (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3: Σχηματισμός φουρανόζης

Με την κυκλοποίηση της ανοικτής αλυσίδας, οι μονοσακχαρίτες αποκτούν δομή είτε φουρανόζης είτε πυρανόζης, όπου στη θέση που προϋπήρχε ο καρβονυλικός άνθρακας δημιουργείται ένα καινούριο στερεογονικό κέντρο, ενώ τα δύο διαστερομερή χαρακτηρίζονται ως ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας ως ανωμερικό κέντρο.

1.3 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες, δομές οι οποίες αποτελούνται από μια βάση (αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) και μια πεντόζη (ριβόζη, δεοξυριβόζη), είναι βασικά συστατικά σε μία ποικιλία βιολογικών συστημάτων. Οι νουκλεοζίτες μπορεί να είναι ριβονουκλεοζίτες ή δεοξυριβονουκλεοζίτες, αναλόγως την πεντόζη. Όταν ένας νουκλεοζίτη ενώνεται με φωσφορικό οξύ η δομή που σχηματίζεται ονομάζεται

νουκλεοτίδιο (ή εστέρας του νουκλεοζίτη) και υπάρχουν δύο είδη νουλεοτιδίων, το ριβονουκλεοτίδιο και το δεοξυριβονουκλεοτίδιο, τα οποία παίρνουν το όνομα τους ανάλογα με τον νουκλεοζίτη.

Η ένωση πολλών νουκλεοτιδίων με δεσμό που ονομάζεται φωσφοδιεστερικός είναι η Πολλά νουκλεοτίδια που ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς αποτελούν τα νουκλεϊκά οξέα. Ο δεσμός ονομάζεται συγκεκριμένα 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός καθώς δημιουργείται από την εστεροποίηση της φωσφορικής ομάδας που βρίσκεται στην 5' θέση του δεύτερου νουκλεοτιδίου με την ελεύθερη -OH που βρίσκεται στην 3' θέση του προηγούμενου νουκλεοτιδίου.

Η δημιουργία του 3'-5' φωσφοδιεστερικού δεσμούς οδηγεί στον σχηματισμό δινουκλεοτίδια, τρινουκλεοτίδια, τετρανουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και τέλος πολυνουκλεοτίδια. Δημιουργείται δηλαδή στα νουκλεϊνικά οξέα ένα σκελετός που αποτελείται από επναλαμβανόμενα μόρια φωσφορικών και ριβοζών ή δεοξυριβοζών πάνω στις οποίες είναι ενωμένες οι αζωτούχες βάσεις (πυρίνες ή πυριμιδίνες).

Το νουκλεϊκό οξύ λαμβάνει το όνομα του ανάλογα με τη ριόζη που περιέχει. Έτσι, όταν υπάρχει η D-ριβόζη ως υδατάνθρακα, το νουκλεϊκό οξύ χαρακτηρίζεται ως ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA), ενώ όταν υπάρχει η D-2-δεοξυριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεονικό οξύ (DNA) (Berg *et al.*, 2001). Η ετεροκυκλική βάση των νουκλεοζιτών ενώνεται στη θέση 1' της πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό, στον οποίο η βάση εντοπίζεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου (Page, 1997). Τέλος, στα φυσικά μακρομόρια οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί έχουν στερεοδιάταξη β (εικόνα 4).

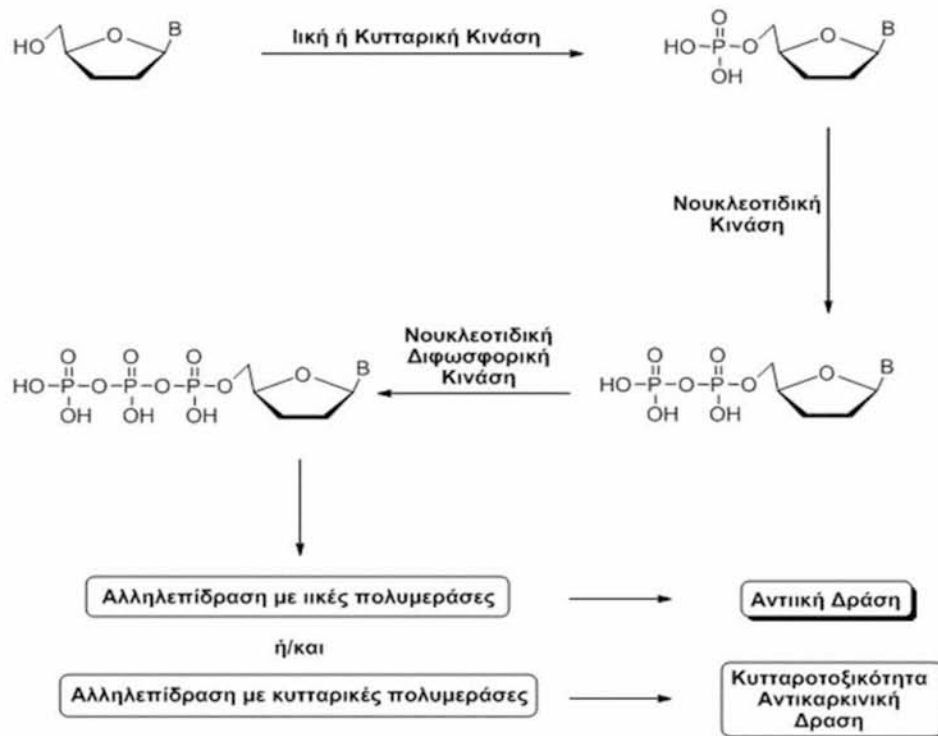
είναι μεμβρανικός υποδοχέας στην επιφάνεια των κυττάρων, διάλυτος ιόντων, μόριο μεταφορέας, ένζυμο, πυρηνικός υποδοχέας κ.λ.π. Στις περιπτώσεις ενδοκυτταρικών στόχων, το φάρμακο θα πρέπει να μπορεί πρώτα να εισέλθει στο κύτταρο ώστε να έρθει σε επαφή με το στόχο και να δράσει σύμφωνα με τις ιδιότητες του.

Ένα ακόμα σημαντικό κριτήριο επιλογής ενός φαρμακευτικού μορίου είναι η εκλεκτικότητά του όσον αφορά τον μοριακό στόχο, η ικανότητα δηλαδή να αλληλεπιδρά κυρίως με τον μοριακό στόχο του οποίου την λειτουργία θέλουμε να τροποποιήσουμε και με όσο το δυνατόν μικρότερη αλληλεπίδραση με άλλα μόρια του κυττάρου ώστε να αποφευχθεί πιθανή παρεμβολή σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου και η πιθανή τοξικότητα που μπορεί να προκύψει από αυτές.

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών είναι στην πραγματικότητα μόρια που αρχικά είναι ανενεργά και μπορούν να χαρακτηριστούν ως προφάρμακα. Για να δράσουν θα πρέπει να τροποποιηθούν μετά τον μεταβολισμό τους όταν εισέλθουν στο κύτταρο, τροποποίηση η οποία δεν μεταβάλλει όμως τα χαρακτηριστικά του αρχικού μορίου. Οι ενεργές μορφές μετά την τροποποίηση τους και αν αυτή είναι η επιθυμητή μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων ασκώντας με αυτό τον τρόπο την κυτταροτοξική ή αντιϊκή τους δράση.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μετά από φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτών από κινάσες είτε των κυττάρων είτε των ιών (Van Rompay *et al.*, 2001). Μετά την φωσφορυλίωση αυτή και τη δημιουργία τριφωσφορικών δομών παρεμποδίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή των ιών και την αντιγραφή και διπλασιασμό του DNA (Εικόνα5).

Η παρεμπόδιση της αντιγραφής γίνεται με ενσωμάτωση τους εντός του ιϊκού γονιδιώματος με αποτέλεσμα να διακόπτεται η αντιγραφή του, να μην θεωρείται λειτουργικό και κατ' επέκταση να καταστέλλεται ο



Εικόνα 5: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες

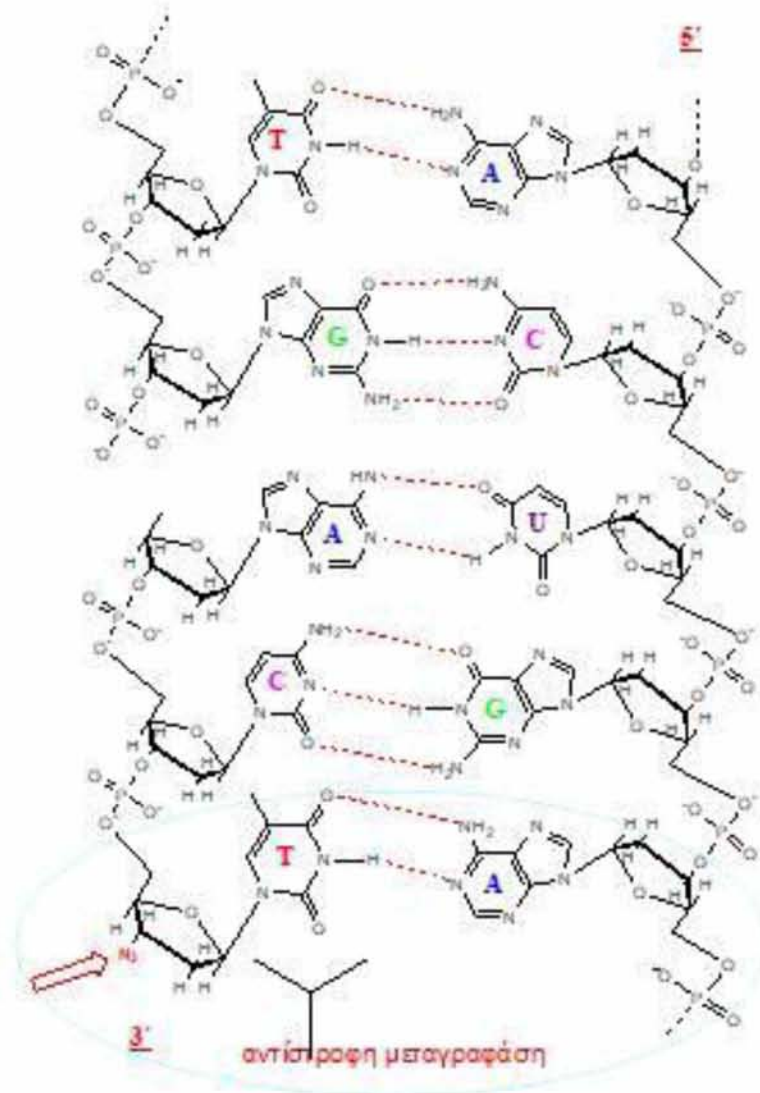
πολλαπλασιασμός του ιού και η δημιουργία νέων ιϊκών σωματιδίων

Η καθολικότητα του τρόπου και του μηχανισμού αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος οδηγεί στην υπόθεση πως τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να δρουν έναντι μιας ποικιλίας ιών. Επίσης, σημαντικό είναι να σημειωθεί πως το νουκλεοζιτικό ανάλογο εμφανίζει μεγάλη συγγένεια με την ιϊκή πολυμεράση κάτι που προφανώς συνδέεται με την εκλεκτικότητα των αναλόγων έναντι μολυσμένων από ιούς κυττάρων. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως όσο αυξάνεται η συγγένεια του αναλόγου τόσο αυξάνεται και η

εκλεκτικότητα του ως θεραπευτικός παράγοντας.

Η διακοπή της επιμήκυνσης της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του DNA κατά την αντιγραφή αποτελεί έναν μηχανισμό δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών η οποία επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση του νουκλεοζίτη στην αλυσίδα. Οι DNA πολυμεράσες των κυττάρων λειτουργούν με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, τοποθετούν δηλαδή ένα νουκλεοτίδιο με τέτοια φορά ώστε η νέα αλυσίδα να δημιουργείται από το $5'$ άκρ της προς το $3'$ άκρο της. Κατά τη δημιουργία του $3'-5'$ φωσφοδιεστερικού δεσμού απελευθερώνεται μία πυροφωσφορική ομάδα. Στις περιπτώσεις που το ανάλογο του νουκλεοτιδίου δεν έχει 3-OH δεν μπορεί να δημιουργηθεί φωσφοδιεστερικός δεσμός καθώς δεν ενώνεται κάτι με την $5'$ -φωσφορική ομάδα του άλλου νουκλεοτιδίου με αποτέλεσμα τον τερματισμό της επιμήκυνσης του DNA. Η εκλεκτικότητα της δράσης των νουκλεοζιτών έναντι των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από ιό σχετίζεται με την συγγένεια που μπορεί αυτός να εμφανίζει με την πολυμεράση του ιού **(Σχήμα 2)**.

Εκτός της αντιϊκής δράσης με διακοπή της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του DNA, ένας άλλος μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών είναι να δρουν εναντίον των βακτηρίων, ως αντιβιοτικά. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός οφείλεται στην ικανότητα τους είτε να καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη ή το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων είτε να εμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση και την ιοντική μεταφορά.



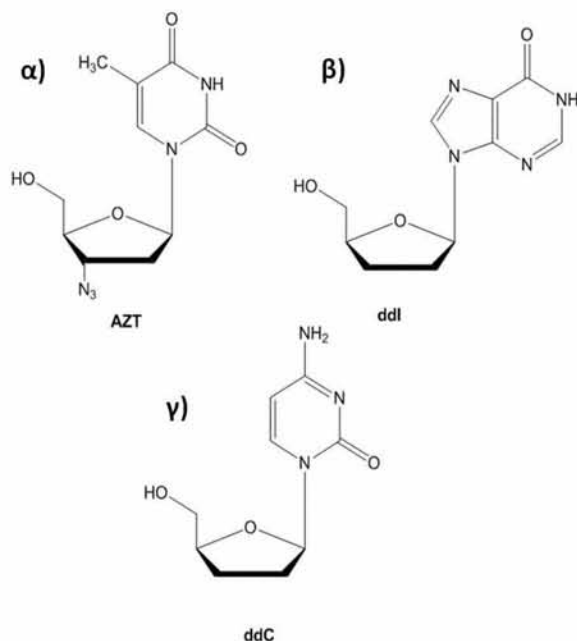
Σχήμα 2: Μηχανισμός δράσης του ανάλογου όταν δεν περιέχει 3'-OH

1.5. Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες

Η δεύτερη ιδιότητα των νουκλεοζιτών καθώς και αναλόγων τους είναι αυτή που σχετίζεται με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ιών και την καταστροφή του ιού. Η ιδιότητα αυτή σχετίζεται με την ικανότητα των

νουκλεοζιτών και των αναλόγων τους να επιδρούν στους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς παράγοντες των ιών. Διάφορα ανάλογα των νουκλεοζιτών ήδη χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση διάφορων ιών .

Για παράδειγμα έναντι του ιού HIV, που είναι ο ιός που προκαλεί το AIDS χρησιμοποιηθεί η Zalcitabinedd ή DDC, η Zidovudine ή AZT, η Didanosine ή ddI, το abacavir, το 2'-3' διδεσοξυ-3'-θειακυτιδίνη ή 3TC και το d4T τα οποία επιδρούν στην αντίστροφη μεταγραφάση αναστέλλοντας την αντίστροφη μεταγραφή (Vastman *et al.*, 2001) **(Εικόνα 6)**. Για την αντιμετώπιση του ιού HBV, δηλαδή του ιού της ηπατίτιδας Β, έχει ήδη εγκριθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες η χρήση του 3TC σε συνδυασμό με την ιντερφερόνη α. Ακόμη ανάλογα όπως είναι η ακυκλοβίρη, η τριλουριδίνη, η βαλακυκλοβίρη, η βιδαραβίνη και η γανσικλοβίρη χρησιμοποιούνται



Εικόνα 6: Οι χημικές δομές των α) AZT, β) ddI και γ) DDC

εναντίον του κυτταρομεγαλοϊού CMV καθώς και των HSV 1 και HSV 2, οι οποίοι είναι ιοί της κατηγορίας των ερπητοϊών και του ιού VZV ο οποίος προκαλεί των έρπητα ζωστήρα (Gumina *et al*, 2001).

1.6. Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

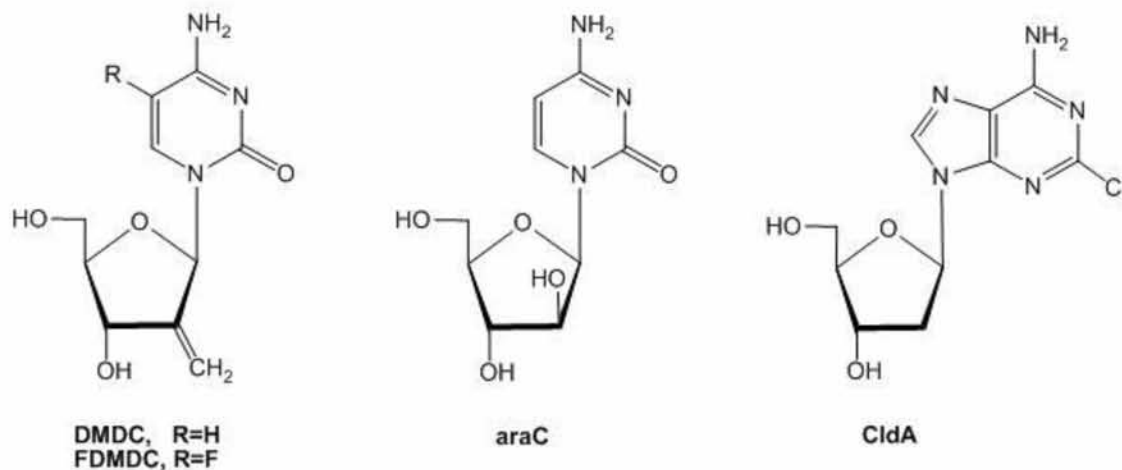
Τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού και όχι μόνο, διαφοροποιούνται, πολλαπλασιάζονται και οδηγούνται στον κυτταρικό θάνατο υπό τον αυστηρό έλεγχο διαφόρων ενδοκυτταρικών μονοπατιών τα οποία συμβάλλουν στην εύρυθμη λειτουργία τους και κατ' επέκταση στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Στα ενδοκυτταρικά μονοπάτια και γενικότερα σε όλες τις ενδοκυττάρειες διαδικασίες που σχετίζονται με τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων συμμετέχουν ορμόνες, μεμβρανικοί υποδοχείς δηλαδή μία ποικιλία διαφόρων χημικών μηνυμάτων.

Η απώλεια της ικανότητας ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά την οποία τα κύτταρα οδηγούνται συνεχώς σε μιτωτική διαίρεση ενώ περνούν και σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή διαίρεση τους και τη δημιουργία καρκινωμάτων και όγκων.

Οι ερευνητές εδώ και δεκαετίες ψάχνουν τη χρυσή τομή για την αντιμετώπιση του καρκίνου και πολλοί έχουν εστιάσει στην ανάπτυξη και μελέτη χημειοθεραπευτικών φαρμάκων τα οποία να έχουν υψηλή δραστηριότητα αλλά να μην παρουσιάζονται υψηλά ποσοστά τοξικότητα για τον ασθενή, να εμφανίζουν βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη ενώ επιδιώκεται να έχουν και ευρύ φάσμα δράσης (Came and Caliguirri, 2012). Έχει ήδη διαπιστωθεί πως τα παραπάνω χαρακτηριστικά πιθανόν να τα διαθέτουν τα ανάλογα των νουκλεοζιτών πολλά από τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως έναντι μεγάλου φάσματος νεοπλασιών λόγω της ικανότητας τους να

εμποδίζουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων του κυττάρου που έχει μετατραπεί σε καρκινικό. Μερικά παραδείγματα τέτοιων νουκλεοζιτών είναι **(Εικόνα 7)** (Cory et al., 1994):

- ❖ 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο) κυτοσίνη (DMDC),
- ❖ 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC),
- ❖ 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και
- ❖ 2-χλωρο-2'-δεσοξαδενοσίνη (CldA)

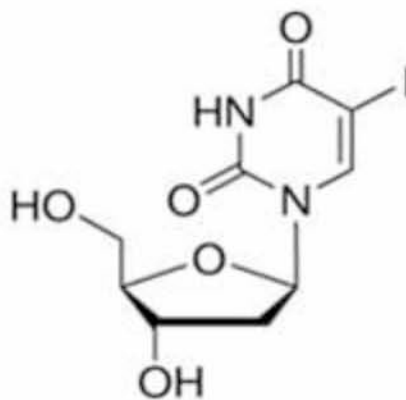


Εικόνα 7: Οι χημικές ομάδες των DMDC, araC και CldA

Μελέτες έχουν δείξει τα υψηλά ποσοστά κυτταροστατικής δράσης των συγκεκριμένων νουκλεοζιτών σε διάφορους τύπους καρκίνου καθώς σε λεμφώματα και λευχαιμίες. Επιπρόσθετα, τα συγκεκριμένα ανάλογα αποδείχθηκε πως λειτουργούν ενεργοποιώντας το αποπτωτικό μονοπάτι, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο. Η παρατήρηση αυτή ενίσχυσε ακόμη περισσότερο την άποψη για τη χρησιμότητα των νουκλεοζιτών που αναφέρονται παραπάνω.

1.7. Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση

Ο πρώτος νουκλεοζίτης όπου χαρακτηρίστηκε κλινικά αποτελεσματικός και παράλληλα εγκρίθηκε ήταν η 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνη στις αρχές του 1960, όπου η συγκεκριμένη σύνθεση ανήκε σε ένα αντικαρκινικό πρόγραμμα (Vorbrüggen H., & Ruh-Pohlenz C., 2001; Vorbrüggen H. &

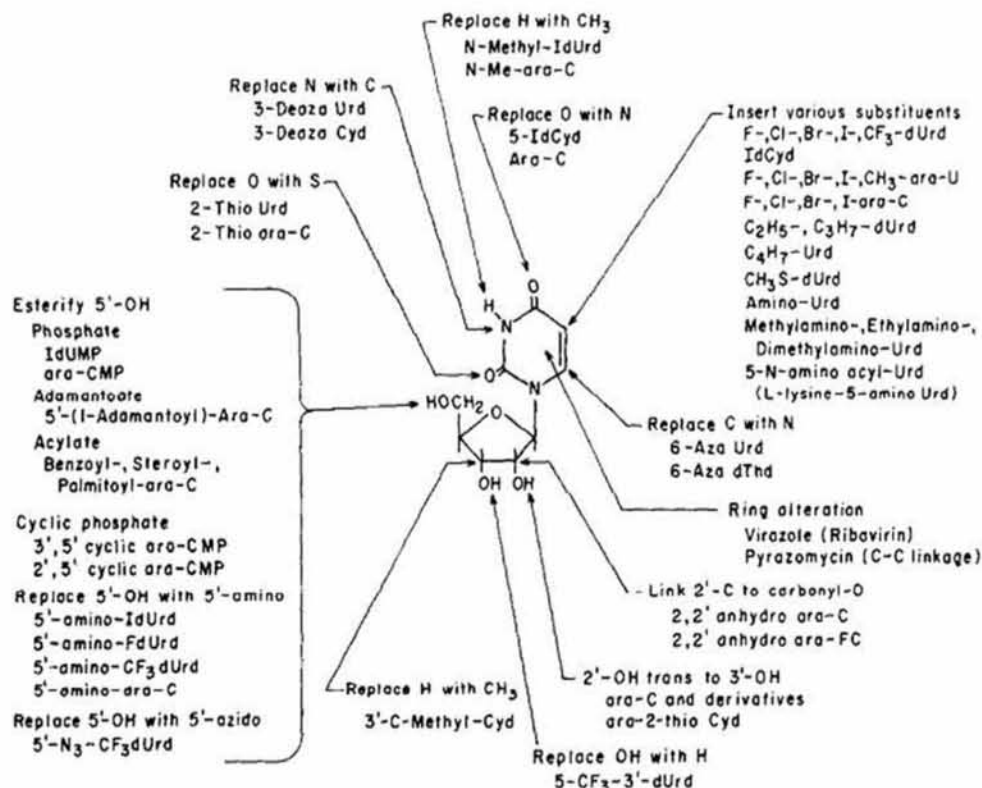


Höfle G., 1981; Prusoff, 1959; William *et al.*, 1976).

Οι Johnsons και John (Johnson and Johns, 1906) είχαν αναφέρει τη σύνθεση 5'-ιώδοπυριμιδινών το 1906. Το 1945, οι Hitchings και συνεργάτες. (Hitchings *et al.*, 1945) άρχισαν λεπτομερή μελέτη της βιολογικής δράσης διαφόρων παραγόντων της πουρίνης και της πυριμιδίνης. Παρ' όλα αυτά μία ομάδα (Thompson *et al.*, 1949) ανέλυσε την μέτρια αναστολή από την 5-βρωμοουρακίλη, την 5-υδρόξουρακίλη και τη 2,4-διθυοθυμίνη της αντιγραφής του ιού της δαμαλίτιδας σε κυτταρική καλλιέργεια. Οι Visser και

Εικόνα 8: Η χημική δομή της 5'-ιώδο-2'-δεοξουριδίνη
συνεργάτες (Visser *et al.*, 1952) έδειξαν ότι διάφορα 5-υποκατεστημένα

παράγωγα της ουριδίνης (5-χλώρο, 5-διάζο, 5-φορμαμιδο, 5-υδροξύ και 5-άμινο) εμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό του ιού της εγκεφαλίτιδας του ποντικού Theiler σε καλλιέργεια εγκεφάλου ποντικού. Η τροποποίηση των νουκλεοζιτών μπορεί, λοιπόν, να αποδώσει στον νουκλεοζίτη αντιϊκή δράση. Η τροποποίηση μπορεί να γίνει με μία ποικιλία τρόπων (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Τύποι τροποποίησης που αποδίδουν αντιϊκή δράση στους νουκλεοζίτες

Τα ακόρεστα 5-υποκατεστημένα παράγωγα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και ειδικά η 5-Ιωδο-2'-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, Ιδοξουριδίνη). Συγκεκριμένα το IdUrd μπορεί να αναπτυχθεί ως ένα νουκλεοτιδικό φάρμακο που θα είναι κλινικά αποτελεσματικό όταν γίνεται μία μόλυνση από έναν ιό. Ο μηχανισμός της αντιϊκής δράσης της IdUrd σχετίζεται με τις δυσμενείς βιολογικές επιπτώσεις της ενσωμάτωσης του αναλόγου της

θυμιδίνης σε ιϊκό DNA (Prusoff and Goz., 1973; Prusoff and Goz, 1975).

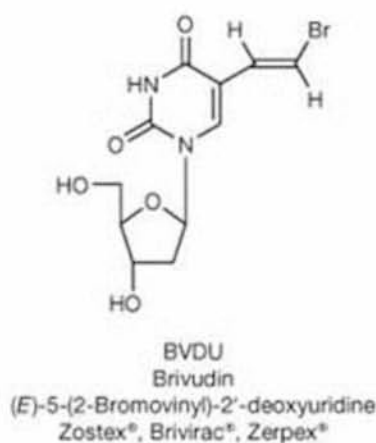
Η ενσωμάτωση της IdUrd στο DNA φυσιολογικών μη μολυσμένων κυττάρων, πιθανόν να προκαλεί τοξικότητα, η οποία έχει βρεθεί κατά τη διάρκεια είτε της τοπικής είτε της συστηματικής θεραπείας. Η συστηματική τοξικότητα είναι δόσοεξαρτώμενη και όταν εισάγεται καθημερινά στον άνθρωπο σε συγκέντρωση περίπου 100mg/kg για 5 ή 6 ημέρες, μπορεί να παρατηρηθεί στοματίτιδα, λευκοπενία και αλωπεκία (Calabresi *et al.*, 1961). Ωστόσο, δημιουργούνται και άλλες ανησυχίες όπου ο άνθρωπος δύσκολα τις αξιολογεί, και περιλαμβάνουν την ικανότητα της IdUrd να:

- προκαλέσει τον σχηματισμό ιών σε καλλιέργεια κυττάρων
- αυξήσει το ρυθμό μετάλλαξης των βακτηρίων
- δημιουργήσει χρωμοσωμικές βλάβες
- επηρεάσει την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση

Γι' αυτό, η IdUrd θα μπορούσε να είναι η πρώτη ένωση που παρουσιάζει ξεκάθαρα μια επιτυχημένη θεραπεία μιας καθιερωμένης λοίμωξης από ιό στον άνθρωπο (Prusoff and Goz, 1975). Το ενδιαφέρον για τους 5-υποκατεστημένους νουκλεοζίτες ως πιθανά αντιϊκά παράγωγα έχει αυξηθεί (Prusoff & Fischer, 1979) μετά τη σύνθεση της 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνης (IDU) από τον Prusoff (Prusoff, 1959). Μεταξύ αυτών, η BVDU [E-5- (2-βρωμοβινυλ) -2'-δεοξουριδίνη] χαρακτηρίζεται ένας από τους πιο ισχυρούς και εκλεκτικούς αναστολείς της αντιγραφής του ιού του έρπητα, και ιδιαίτερα του ιού του απλού έρπητα τύπου-1 (HSV-1) (De Clercq *et al.*, 1979). Μεγάλο μέρος του BVDU και σχετικών ενώσεων φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα της HSV-1 κινάσης της θυμιδίνης (TK) να δεχτεί τέτοια ανάλογα ως υποστρώματα, σε αντίθεση με την ανικανότητα του

αντίστοιχου ενζύμου ξενιστή (Arner E.S. and Eriksson, S. 1995; Cheng *et al.*, 1981). Ακόμη, η τριφωσφορική BVDU αναστέλλει την HSV-1 DNA πολυμεράση πιο αποτελεσματικά από ότι αναστέλλει τις κυτταρικές DNA πολυμεράσες (Allaudeen *et al.*, 1981).

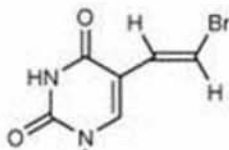
Η IDU χαρακτηρίζεται ως ένας αντι-HSV παράγοντας για τη θεραπεία της ερπητικής κερατίτιδας από τους Kaufman and Heidelberger (1964). Η αποτελεσματικότητα της Ιδοξουριδίνης στη θεραπεία του απλού έρπητα του επιθηλίου του κερατοειδούς στον άνθρωπο, μία ασθένεια που αποτελεί την κύρια αιτία τύφλωσης λόγω της μόλυνσης του κερατοειδούς στις ΗΠΑ, έχει αποδειχθεί και εγκριθεί από τον FDA (Kaufman, 1962; Kaufman *et al.*, 1962a; Kaufman *et al.*, 1962b). Επιπλέον, μπορεί να χαρακτηριστεί ως το σημείο εκκίνησης για την σύνθεση διαφόρων νέων παραγώγων 5-υποκατεστημένων-2'-δεοξουριδίνης. Το σημαντικότερο παράγωγο αυτής της σειράς είναι η (*E*)-5-(2-βρωμοβινυλο)-2'-δεοξουριδίνη (Brivudin/BDU), όπου φάνηκε πολύ καλός ειδικός αναστολέας του HSV-1, καθώς επίσης και του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα (VZV) (McGuigan *et al.* 1974; Shigeta *et*



Εικόνα 10: Χημική δομή της BVDU

al., 1983). Το ομόλογο του BVDU (**Εικόνα 10**), η 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-*E*-5-(2-βρωμοβινυλο) ουρακίλη (BVaraU), βρέθηκε ότι είναι εξίσου ισχυρό, αν όχι και περισσότερο από το BVDU, κατά του ιού VZV (De Clercq *et al.*, 1980; De Clercq, 2013).

Η BV-araU παρουσιάζει αντιϊκή δράση και έναντι εργαστηριακών στελεχών και απομονωμένων κλινικών προϊόντων όταν δοκιμάζεται σε διάφορους ανθρώπινους ινοβλάστες και σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών πιθήκου (**Εικόνα 10**) (Haruhiko *et al.*, 1991).



Εικόνα 11: Η χημική δομή της BVaraU

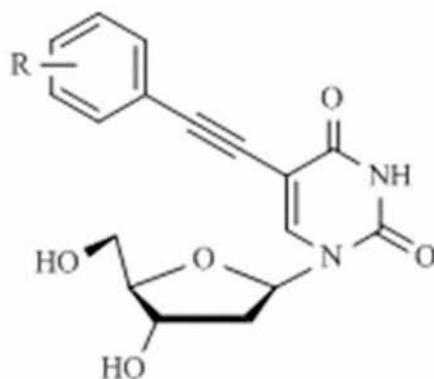
2. ΣΚΟΠΟΣ

Η αντιμετώπιση τόσο της νόσου του καρκίνου όσο και τον ολόένα και αυξημένων ποσοστών των ιϊκών λοιμώξεων έχει καταστήσει επιτακτική την ανάγκη εύρεσης και ανάπτυξης καινούριων πρωτότυπων θεραπευτικών προσεγγίσεων με σκοπό την αύξηση της αποτελεσματικότητας στην αντιμετώπιση της νόσου ή της λοίμωξης και την ταυτόχρονη μείωση της τοξικότητας άρα και των παρενεργειών που προκαλούνται κατά τη θεραπευτική αντιμετώπιση.

Σε αυτή την κατεύθυνση παρατηρείται μία ολόένα και αυξανόμενη τάση δημιουργίας και προώθησης φαρμακευτικών σκευασμάτων στα οποία η περιεχόμενη δραστική ουσία είναι κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο. Η τροποποίηση των νουκλεοζιτών απασχολεί εντόνως την επιστημονική

κοινότητα τα τελευταία χρόνια. Ειδικότερα, διάφορες μελέτες έχουν εστιάσει στην τροποποίηση βάσης διάφορων φουρανο-νουκλεοζιτών καθώς παρατηρήθηκε αύξηση της αντιϊκής και αντικαρκινικής δράσης.

Στην παρούσα μελέτη, λοιπόν, σκοπός είναι η δημιουργία μέσω τροποποίησης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων τα οποία θα εμφανίζουν ισχυρή αντιϊκή δράση. Συγκεκριμένα, εστίασαμε στην υποκατάσταση της ετεροκυκλικής βάσης της ουρακίλης με σκοπό τη σύνθεση μίας καινούριας τάξης φουρανο-νουκλεοζιτών, της οποίας οι ενώσεις θα μελετηθούν με σκοπό να διερευνήσουμε τη δράση τους ως αντικαρκινικοί και αντιϊκοί



Εικόνα 12: Τροποποιημένος στη βάση και στο σάκχαρο φουρανο-νουκλεοζίτης με υποκαταστάτες $R=O-Cl$ (a), $O-F$ (b)

παράγοντες (**Εικόνα 12**).

3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αντιδράσεων και πραγματοποιείται με χρήση ειδικών πλακών αλουμινίου οι

3.2. Χρωματογραφία στήλης

Μετά την απομόνωση μίας χημικής ουσίας είναι απαραίτητο να απομονωθεί και να καθαριστεί από όλα τα παραπροϊόντα και τους διαλύτες που περιέχονται εντός του διαλύματος. Η πειραματική τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η χρωματογραφία στήλης και πραγματοποιείται μετά από με την εισαγωγή σε silica gel (240-400, Merck grade) αέρα υπό πίεση (flash chromatography).

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη η οποία κατασκευάζεται από αδρανές υλικό όπως για παράδειγμα ύαλος, πηκτή πυριτίας, ανοξείδωτος χάλυβας. Το προς εξέταση δείγμα τοποθετείται με προσοχή στην κορυφή της στήλης και η κινητή φάση εξαναγκάζεται με την χρήση πίεσης ή λόγω της βαρύτητας να περάσει τη στατική φάση. Έτσι, τα συστατικά που περιέχονται στο δείγμα μετακινούνται προς την βάση της στήλης αλλά με διαφορετικές ταχύτητες οι οποίες εξαρτώνται από τη συγγένεια των συστατικών προς την στατική φάση.

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφιση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουσή τους με μια ακίνητη φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσροφούνται και κολλούν στην κορυφή της στήλης και χρειάζονται ένας πιο πολικό διαλύτη για να προχωρήσουν. Οι άπολες ουσίες συνήθως προχωρούν ή κατεβαίνουν πολύ πιο εύκολα ακόμη και με διαλύτες οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως χαμηλής πολικότητας. Για την έκλυση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλυση της στήλης με διάφορους διαλύτες

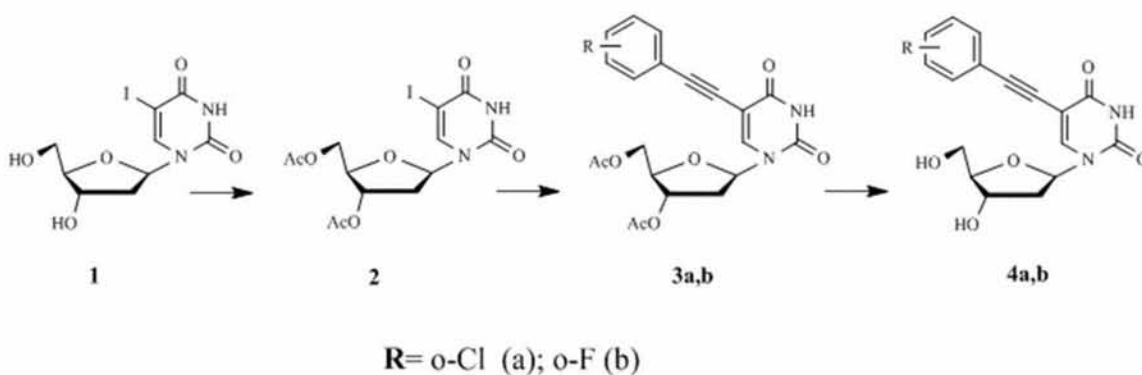
της πειραματικής διαδικασίας. Η διαδικασία ταυτοποίηση περιλαμβάνει τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

Για την παραλαβή των φασμάτων ^1H NMR έγινε μέτρηση με φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO}-d_6$). Ως σημείο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s(single), d(doublet), dd(doublet doublet), dtr(doublet triplet), m multiplet) ενώ οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι, οι λιγότεροι όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανakλώνται στην ιδιότητα του σπίν. Στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της μεταξύ της ύλης και της, με σκοπό τη μελέτη των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων της.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1.Επισκόπηση της συνθετικής οδού



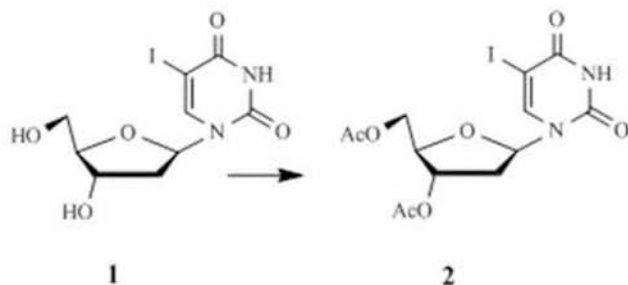
4.2. Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πρώτη ύλη για την έναρξη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 2'-δέοξυ- 5 ιωδοουριδίνη (**1**), η οποία υπόκειται σε προστασία των υδροξυλίων παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) σε πυριδίνη, γίνεται ακετυλίωση της ένωσης και λαμβάνουμε την 3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη της 5-ιωδοουρακίλης (**2**) με απόδοση 85% (Robins and Barr, 1983). Εν συνεχεία, με αντίδραση Sonogashira (Tierney J. and Lidström P., 2005; Harukiko *et al.*, 1991) παίρνουμε τα προστατευμένα προϊόντα **3a,b**. Ένα τυπικό πείραμα Sonogashira είναι το παρακάτω (Heravi and Sadjadi, 2009):

Ο φούρανο-νουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (**2**) διαλύεται σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et₃N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (καταλύτης), πραγματοποιείται σύζευξη τους υπό ακτινοβολία μικροκυμάτων με ισχύ 200W και διάρκεια 5 λεπτών σε θερμοκρασία 60°C, σε αποδόσεις 69-74% (Tierney and Lidström, 2005; Himo *et al.*, 2005; Appukkuttan *et al.*, 2004). Τέλος, η ολοκλήρωση της σύνθεσης πραγματοποιείται με την αποπροστασία των προϊόντων **3** σε διάλυμα

κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τους νουκλεοζίτες **4a-b**, σε αποδόσεις 91-92%.

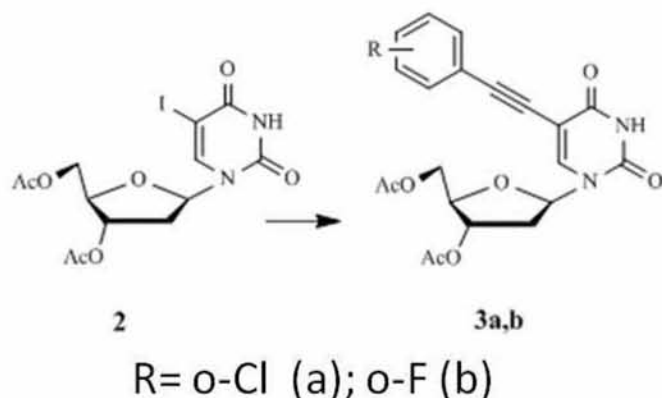
4.2.1. Σύνθεση της 1-(3',5'-δι-O-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη) -5-ιωδοουρακίλης (**2**)



Η ένωση **1** διαλύθηκε σε πυριδίνη (1,6 ml) και προστέθηκε οξικός ανυδρίτης (0,7 ml) με σκοπό να ακετυλιωθεί η ένωση και να ληφθεί η **4**. Εν συνεχεία το προϊόν συμπυκνώθηκε και καθαρίστηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας 20% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο ως κατάλληλο διαλύτη έκλουσης. Το επιθυμητό προϊόν **2** (264,3mg) που λήφθηκε ήταν στη μορφή άχρωμου ελαίου (**Πίνακας 1**).

TLC (Διάλυμα B)	$R_f = 0,4$
Απόδοση	85%

Πίνακας 1: Πίνακας απόδοσης για το προϊόν **2**



4.2.2.Σύνθεση των (3)

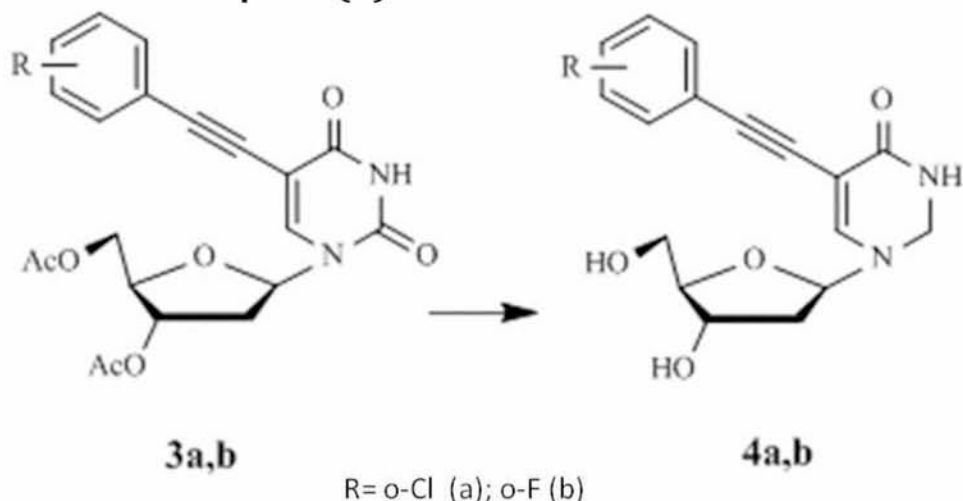
Για τη σύνθεση του **3** χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Sonogashira με μικροκύματα (Štimac *et al.*, 1992). Η 1-(3',5'-δι-O-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη)-5-ιοδοουρακίλης (**2**) (0,41mmol, 206mg) διαλύεται σε 5 ml άνυδρου διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), 2 eq του κατάλληλου τελικού αλκινίου, τριφαινυλοφωσφορικό παλλάδιο [Pd(PPh₃)₄] (0,1 eq, 323,6 mg, 0,28mmol), ιωδιούχο χαλκό (0,1 eq, 53,7 mg, 0,28 mmol), τριαιθυλαμίνη (3 eq, 1,2ml), και έπειτα χρησιμοποιούνται τα μικροκύματα σε συνθήκες 200 Watt, για 5 λεπτά στους 60°C (.

Για την παραλαβή του προϊόντος γίνεται εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, παραλαβή της οργανικής φάσης, ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄ και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Εν συνεχεία γίνεται καθαρισμός με σκοπό την απομάκρυνση του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο ως κατάλληλο διαλύτη έκλουσης. Τα επιθυμητά προϊόντα **3a** (138 mg), **3b** (148 mg), ελήφθησαν υπό τη μορφή κίτρινου αφρού με απόδοση 69% και 71% (Πίνακας 2).

	Προϊόν 3a	Προϊόν 3b
TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0,22$	$R_f = 0,18$
Απόδοση	69%	71%
$[\alpha]_D^{22}$	-22	+16
λ_{max}	292 nm	294 nm

Πίνακας 2: Πίνακας απόδοσης για τα προϊόντα **3a** και **3b**

4.2.3. Σύνθεση των (4)



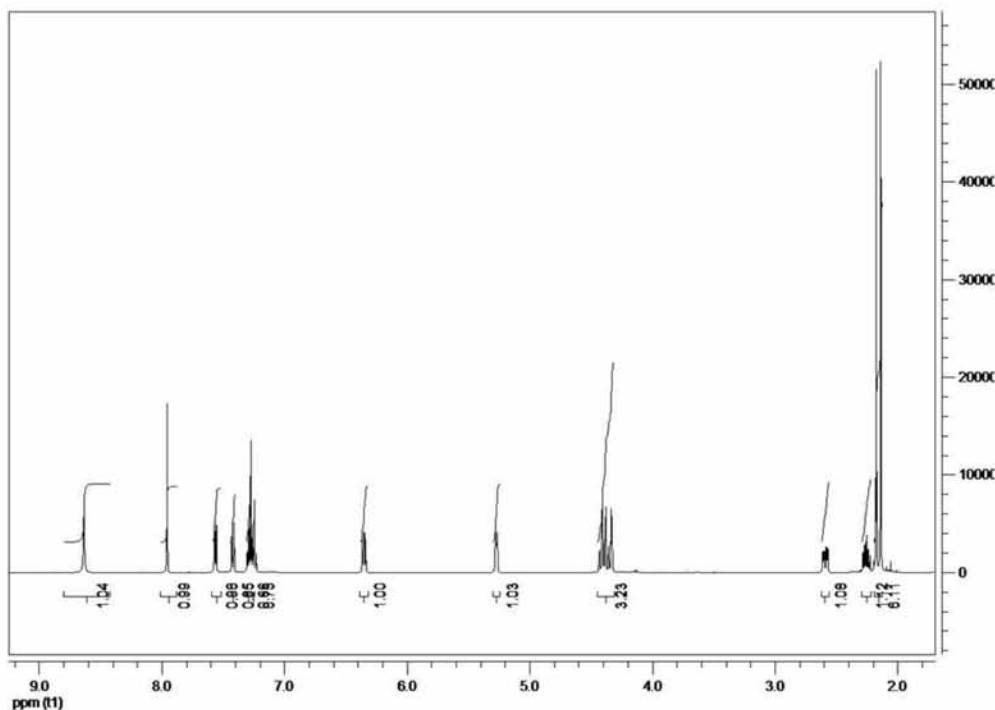
Γίνεται ανάδευση του διαλύματος των προστατευμένων νουκλεοζιτών **3a** (100 mg, 0,2mmol), **3b** (100 mg, 0,2mmol) σε κορεσμένη μεθανολική αμμωνία (262,5 ml) για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Έπειτα γίνεται απομάκρυνση του διαλύτη με χρήση κενού ενώ οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται χρησιμοποιώντας χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, διάλυμα 10% μεθανόλης σε CH_2Cl_2 , ως

κατάλληλο διάλυμα έκλουσης. Έτσι, παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **3a** (63,7mg), **3b** (66 mg) αντίστοιχα, με μορφή κίτρινου ελαίου (Πίνακας 3).

	Προϊόν 4a	Προϊόν 4b
TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f = 0,4$	$R_f = 0,37$
Απόδοση	92%	91%
$[\alpha]_D^{22}$	-4	+2
λ_{max}	292 nm	294nm

Πίνακας 3: Πίνακας απόδοσης των προϊόντων 4a και 4b

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR - Φάσμα ^1H NMR του προϊόντος 3a



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ερευνητικές προσπάθειες των τελευταίων δεκαετιών εστιάζουν εδώ και δεκαετίες κατά κύριο λόγο στη βελτίωση των παρεχόμενων θεραπευτικών μεθόδων καθώς και στην αύξηση της αποτελεσματικότητας αυτών των μεθόδων ενάντια στη νόσο του καρκίνου αλλά και στην αντιμετώπιση ιϊκών μολύνσεων. Η εμφάνιση και των δύο αυτών κατηγοριών δυσάρεστων για την υγεία του ανθρώπου καταστάσεων τείνει να αυξάνει σε ποσοστό προσβάλλοντας ολοένα και περισσότερους ανθρώπους.

Σε αυτή την κατεύθυνση πολλές ερευνητικές προσπάθειες γίνονται με σκοπό νουκλεοζιτικών αναλόγων τα οποία να εμφανίζουν τόσο υψηλή τοξικότητα για τους ιούς και τα καρκινικά κύτταρα όσο και ελάχιστες παρενέργειες για τον άνθρωπο και τον υγιή ιστό. Επίσης, η προσπάθεια εστιάζει και στην υψηλή εκλεκτικότητα της δράσης των αναλόγων.

Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη έγινε καταρχάς η σύνθεση νέων φουρανο-νουκλεοζιτών μετά από τροποποίηση της βάσης θέλοντας να μελετηθεί η αντικαρκινική ή η αντιϊκή δράση αυτών των νέων αναλόγων. Προσπαθήσαμε να σχεδιάσουμε και να εφαρμόσουμε μία πειραματική διαδικασία που θα είναι απλή, γρήγορη, με σύντομα βήματα και μεγάλη ακρίβεια.

Ένα από τα πρώτα πλεονεκτήματα της μεθόδου μας ήταν ότι χρησιμοποιήσαμε για τη σύνθεση μεθόδους που δεν επιβαρύνουν το φυσικό περιβάλλον όπως η χρήση μικροκυμάτων για τη θέρμανση η οποία υπερέχει επίσης της απλής θέρμανσης καθώς η θέρμανση γίνεται ομοιόμορφα με αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης και τη ελάττωση των παραπροϊόντων.

Οδηγηθήκαμε λοιπόν εξαιτίας της σωστής και επιστημονικά ορθής πειραματικής διαδικασίας σε υψηλές αποδόσεις αντιδράσεων ενώ χρησιμοποιώντας ^1H NMR καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε τις ενώσεις που πήραμε.

Τα ανάλογα που δημιουργήθηκαν [3a, 3b, 4a, 4b] μελετήθηκαν για την αντιϊκής του δράση στους ιούς Cocksackie B4 και Respiratory Syncytial Virus. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα:

Ένωση	Concentration unit	Minimum cytotoxic Concentration ^a	EC ₅₀ ^b	
			Cocksackie	Respiratory syncytial virus
3a	μM	100	20	>100
3b	μM	100	54	>100
4a	μM	>100	>100	>100
4b	μM	>100	>100	>100
Ribavirin	μM	>250	250	4.5

Πίνακας 4: Πίνακας αποτελεσμάτων της τοξικότητα των 3a και 3b έναντι των ιών

Για τη σύγκριση της δράσης των αναλόγων χρησιμοποιήθηκε η EC₅₀ η οποία προσδιορίζει τη συγκέντρωση που απαιτείται για την καταστροφή του 50% των κυττάρων-ιών. Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι όλα τα ανάλογα έχουν ισχυρότερη αντιϊκή δράση από την Ribavirin στον ιό Cocksackie. Η Ribavirin αποτελεί ένα ανάλογο με αρκετά αυξημένη δραστηριότητα έναντι διαφόρων ιών, είτε DNA είτε RNA. Παρατηρήσαμε

ότι το EC₅₀ των 3a και 3b είναι πολύ μικρότερη από τα υπόλοιπα ανάλογα αλλά και από αυτό της Ribavirin. Είναι χαρακτηριστικό πως το EC₅₀ του 3a είναι πέντε φορές μικρότερο από το αντίστοιχο των 4a και 4b ενώ είναι πάνω από δέκα φορές μικρότερο από αυτό της Ribavirin. Ακόμη, το EC₅₀ του 3b είναι 2 φορές μικρότερο από αυτό των 4a και 4b και πάνω από 5 φορές μικρότερο από αυτό της Ribavirin. Αντίθετα, τα αποτελέσματα για τον Respiratory Syncytial Virus δείχνουν ότι αν και τα ανάλογα εμφανίζουν αντιϊκή δράση αυτή δεν είναι είναι μεγαλύτερη από αυτή της Ribavirin.

Συμπερασματικά, τα δύο από τα τέσσερα ανάλογα εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα έναντι των ιών που μελετήθηκαν. Θα μπορούσαν λοιπόν να χρησιμοποιηθούν σε εκτεταμένα πειράματα έναντι και άλλων ιών για να παρατηρηθεί ένα έχουν ειδική δράση για κάποιους ιούς ή μπορούν να χρησιμοποιηθούν γενικευμένα. Επίσης, πρέπει να διεξαχθούν πειράματα με χρήση των συγκεκριμένων αναλόγων έναντι φυσιολογικών κυττάρων με σκοπό να διερευνηθεί εάν και εφόσον εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα έναντι αυτών των κυττάρων. Η επιτυχία αυτών των πειραμάτων θα μπορούσε στο μέλλον να οδηγήσει στην *in vivo* δράση αυτών των αναλόγων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allaudeen, H. S., Kozarich, J. W., Bertino, J. R., & De Clercq, E. (1981). On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5), 2698-2702.
2. Appukkuttan, P., Dehaen, W., Fokin, V. V., & Van der Eycken, E. (2004). A microwave-assisted click chemistry synthesis of 1, 4-disubstituted 1, 2, 3-triazoles via a copper (I)-catalyzed three-component reaction. *Organic letters*, 6(23), 4223-4225.
3. Arnér, E. S., & Eriksson, S. (1995). Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacology & therapeutics*, 67(2), 155-186.
4. Berg, J.M., Tymoczko J.L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001 (p) 329-351.
5. Calabresi, P., Cardoso, S. S., Finch, S. C., Kligerman, M. M., Carl, F., Chu, M. Y., & Welch, A. D. (1961). Initial clinical studies with 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Cancer research*, 21(4), 550-559.
6. Came P.E. and Caliguiri L.A., *Chemotherapy and Viral Infections*, Springer Science & Business Media, 2012, 98-100
7. Cheng, Y. C., Dutschman, G., Fox, J. J., Watanabe, K. A., & Machida, H. (1981). Differential activity of potential antiviral nucleoside analogs on herpes simplex virus-induced and human cellular thymidine kinases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 20(3), 420-423.

8. Cory, A. H., Samano, V., Robins, M. J., & Cory, J. G. (1994). 2'-Deoxy-2'-methylene derivatives of adenosine, guanosine, tubercidin, cytidine and uridine as inhibitors of L1210 cell growth in culture. *Biochemical pharmacology*, 47(2), 365-371.
9. De Clercq E, Descamps J, De Somer P, Barr PJ, Jones AS, Walker RT. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 2947-2951. Medline doi:10.1073/pnas.76.6.2947
10. De Clercq E, Degreef H, Wildiers J, et al. Oral (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in severe herpes zoster. *BMJ* 1980; 281: 1178 Medline doi:10.1136/bmj.281.6249.1178
11. De Clercq E., Review: Selective anti-herpesvirus agents, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 2013; 23:93-101
12. Gumina, G., Song, G. Y., & Chu, C. K. (2001). L-Nucleosides as chemotherapeutic agents. *FEMS microbiology letters*, 202(1), 9-15.
13. Haruhiko M., Makiko N., Tatsuo S., and Kozaburo H. Different Antiviral Potencies of BV-araU and Related Nucleoside Analogues against Herpes Simplex Virus Type 1 in Human Cell Lines and Vero Cells, *Microbiol. Immunol*, Vol. 35 (11), 963-973, 1991
14. Heravi, M. M. and Sadjadi, S. (2009). Recent advances in the application of the Sonogashira method in the synthesis of heterocyclic compounds. *Tetrahedron*, 65(37), 7761-7775
15. Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V. V., Noodleman, L., Sharpless, K. B., & Fokin, V. V. (2005). Copper (I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study

- predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, 127(1), 210-216.
16. Hitchings, G. H., Falco, E. A., & Sherwood, M. B. (1945). The effects of pyrimidines on the growth of *Lactobacillus casei*. *Science*, 102(2645), 251-252.
17. Johnson, T.B., & Johns, C.O. (1906). I.—RESEARCHES ON PYRIMIDINS: SOME 5-IODOPYRIMIDIN DERIVATIVES; 5-IODOCYTOSIN Thirteenth Paper. *Journal of Biological Chemistry*, 1(4), 305-318.
18. Komiotis, D., Manta, S., Tsoukala, E., & Tzioumaki, N. (2008). Antiviral unsaturated nucleosides. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)*, 7(4), 219-244.
19. Kaufman HE. Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 109: 251-252. Medline doi:10.3181/00379727-109-27169
20. Kaufman HE, Nesburn AB, Maloney ED. IDU therapy of herpes simplex. *Arch Ophthalmol* 1962; 67: 583-591. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960020583012
21. Kaufman HE, Martola E-L, Dohlman C. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis. *Arch Ophthalmol* 1962; 68: 235-239. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960030239015
22. Kaufman HE, Heidelberger C. Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex keratitis. *Science* 1964; 145: 585-586. Medline doi:10.1126/science.145.3632.585

23. Menzies, I.S. and Seakins, J.W.T. (1976) Paper and Thin Layer Chromatography. Chromatography and electrophoretic Technics, Vol.1 (Smith, I. And Seakins, J.W.T. eds.), *William Heinemann Medical books Ltd.*, 183.

24. McGuigan, C., Brancale, A., Barucki, H., Srinivasan, S., Jones, G., Pathirana, R., ... & Jukes, A. (2001). Furano pyrimidines as novel potent and selective anti-VZV agents. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 12(2), 77-89. Bertina B. Wentworth and EE. Russel Alexander, Isolation of Chlamydia trachomatis by Use of 5-Iodo-2-Deoxyuridine-Treated Cells, *Applied Microbiology*, **1974**, 27(8), 912-916

25. McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 1245, 905.

26. Morisson and Boyd, Οργανική Χημεία, τόμος III Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 1331, p. 758.

27. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 4, 26

28. Prusoff, W. H. (1959). Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochimica et biophysica acta*, 32, 295-296.

29. Prusoff, W. H., & Goz, B. (1973). Potential mechanisms of action of antiviral agents. In *Fedn. Proc. Fedn Am. Socs Exp. Biol* (Vol. 32, No. 6, pp. 1679-87).

30. Prusoff, W. H., & Goz, B. (1975). Halogenated pyrimidine deoxyribonucleosides. In *Antineoplastic and immunosuppressive agents* (pp. 272-347). Springer Berlin Heidelberg.

31. Prusoff, W. H., & Fischer, P. H. (1979). Basis for the selective antiviral and anti-tumor activity of pyrimidine nucleoside analogs. In *Nucleoside Analogues* (pp. 281-318). Springer, Boston, MA.
32. Robins M. J., and Barr P.J. (1983). Nucleic acid related compounds. 39. Efficient conversion of 5-iodo to 5-alkynyl and derived 5-substituted uracil bases and nucleosides. *The Journal of Organic Chemistry*, 48(11), 1854-1862.
33. Shigeta S, Yokota T, Iwabuchi T, et al. Comparative efficacy of antiherpes drugs against various strains of varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 1983; 147: 576-584. Medline doi:10.1093/infdis/147.3.576
34. Štimac, A., & Kobe, J. (1992). An improved preparation of 2, 3, 5-tri-O-acyl- β -D-ribofuranosyl azides by the Lewis acid-catalysed reaction of β -D-ribofuranosyl acetates and trimethylsilyl azide: an example of concomitant formation of the α anomer by trimethylsilyl triflate catalysis. *Carbohydrate research*, 232(2), 359-365.
35. Thompson, R. L., Wilkin, M. L., Hitchings, G. H., Elion, G. B., Falco, E. A., & Russell, P. B. (1949). The effects of antagonists on the multiplication of vaccinia virus in vitro. *Science*, 110(2861), 454-454.
36. Tierney Jason and Lidström Pelle, *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Blackwell Publishing CRC Press, 2005, 31-32
37. Van Rompay, A. R., Norda, A., Lindén, K., Johansson, M., & Karlsson, A. (2001). Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases. *Molecular pharmacology*, 59(5), 1181-1186.

38. Vastmans, K., Froeyen, M., Kerremans, L., Pochet, S., & Herdewijn, P. (2001). Reverse transcriptase incorporation of 1, 5-anhydrohexitol nucleotides. *Nucleic acids research*, 29(15), 3154-3163.
39. Visser, D. W., Lagerborg, D. L., & Pearson, H. E. (1952). Inhibition of Mouse Encephalomyelitis Virus, in vitro, by Certain Nucleoprotein Derivatives. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 79(4), 571-573.
40. Vorbrüggen, H., & Ruh-Pohlenz, C. (2001). *Handbook of nucleoside synthesis* (Vol. 60). John Wiley & Sons.
41. Vorbrüggen, H., & Höfle, G. (1981). Nucleoside Syntheses, XXIII) On the Mechanism of Nucleoside Synthesis. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 114(4), 1256-1268.
42. Wagner C.R., Iyer V.V. and McIntee E.J. (2000). Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Medicinal research reviews*, 20(6), 417-451.
43. William H. Prusoff and David C. Ward,, Commentary, Nucleoside analogs with antiviral activity, *Biochemical Pharmacology*, 1976:25, 1233-1239